

**ANTICORPS ANTI-INHIBITEUR DE L'URACILE-ADN-GLYCOSYLASE ET
LEURS APPLICATIONS POUR LA DECONTAMINATION
DES REACTIONS D'AMPLIFICATION DES ACIDES NUCLEIQUES**

La présente invention est relative à des anticorps dirigés contre
5 l'inhibiteur de l'uracile-ADN-glycosylase, et à leurs applications pour la décontamina-
tion des réactions d'amplification des acides nucléiques.

Les méthodes d'amplification des acides nucléiques comme la
réaction de polymérisation en chaîne (PCR) sont couramment utilisées dans de
nombreux domaines, pour la détection d'acides nucléiques dans des échantillons
10 d'origine diverse ou la préparation d'acides nucléiques. Toutefois, du fait de la sensi-
bilité de ces méthodes qui permettent d'amplifier des quantités infimes d'acide
nucléique cible, les réactions d'amplifications sont susceptibles d'être contaminées par
de l'acide nucléique généré au cours de précédentes réactions d'amplification, présent
dans les réactifs, le matériel ou l'environnement de travail. Cet acide nucléique conta-
15 minant, qui est amplifié au cours des réactions de PCR ultérieures, est à l'origine de
résultats faussement positifs.

Afin d'inactiver cet acide nucléique contaminant, il a été proposé
d'incorporer dans les séquences amplifiées, des nucléotides désoxyuridine
triphosphate (dUTP) à la place des nucléotides désoxythymidine triphosphate (dTTP).
20 L'ADN contaminant, qui contient de la désoxyuridine, est ensuite éliminé spécifique-
ment par l'enzyme uracile-ADN-glycosylase (UDG pour *Uracil-DNA-Glycosylase* ou
UNG pour *Uracil-N-Glycosylase*) qui clive le résidu uracile, générant ainsi des sites
apyrimidiques qui bloquent l'amplification de l'ADN contaminant. De manière plus
précise, préalablement à la réaction d'amplification, l'échantillon est traité par l'UDG
25 de façon à éliminer l'ADN contaminant, puis l'UDG est ensuite inactivée par la
chaleur, de façon à éviter la destruction de l'ADN nouvellement amplifié (Brevet
américain US5418149 au nom de HOFFMANN-LA ROCHE INC ; Brevet américain
US5035996 et Brevets européens EP0401037et EP0415755, au nom de LIFE
TECHNOLOGIES INC).

30 Toutefois, il a été montré que le traitement par la chaleur induit une
inactivation partielle de l'UDG qui conduit à la destruction des molécules d'ADN
nouvellement synthétisées. En effet, l'UDG est inactivée au cours de la réaction

d'amplification qui est effectuée à des températures élevées mais une activité uracile-ADN-glycosylase, suffisante pour dégrader l'ADN nouvellement amplifié, est détectée à la fin de la réaction d'amplification, lorsque les échantillons sont placés à température ambiante ou à une température inférieure (environ + 4°C à + 25°C).

5 Pour inhiber l'activité UDG résiduelle présente à la fin de la réaction PCR, il a été proposé d'utiliser, soit une UDG thermolabile (Demande Internationale PCT WO9201814 au nom de CETUS CORPORATION), soit un inhibiteur de l'UDG (Ugi pour *Uracil-DNA-glycosylase inhibitor* ; Thornton et al., Biotechniques, 1992, 13:180-184, Brevet américain US5536649 au nom de BECTON, DICKINSON
10 AND COMPANY).

Toutefois, l'utilisation de l'Ugi est lourde à mettre en œuvre dans la mesure où l'addition de cet inhibiteur, soit à la fin de l'étape de décontamination par l'UDG, soit à la fin de la réaction d'amplification, implique des manipulations supplémentaires des dispositifs (tubes, plaques) contenant les mélanges réactionnels.

15 En conséquence, les Inventeurs se sont donné pour but de mettre au point une méthode de décontamination des réactions d'amplification des acides nucléiques qui soit efficace et simple à mettre en œuvre et qui réponde ainsi mieux aux besoins de la pratique que les procédés de l'Art antérieur.

Les Inventeurs ont préparé des anticorps anti-Ugi et ils ont montré
20 que l'utilisation de complexes Ugi/anticorps anti-Ugi, à la place de l'Ugi, permettait avantageusement de réaliser la décontamination et l'amplification de l'ADN, sans manipulation supplémentaire ; le mélange réactionnel de départ contenant outre l'échantillon contenant les acides nucléiques à amplifier, et les réactifs indispensables à l'amplification de ces acides nucléiques, l'UDG et l'Ugi inactivé, sous forme de
25 complexes réversibles Ugi/anticorps anti-Ugi.

En conséquence, la présente invention a pour objet un anticorps ou un fragment fonctionnel d'un anticorps comprenant au moins les domaines variables des chaînes lourdes et légères, caractérisé en ce qu'il se lie spécifiquement à l'inhibiteur de l'uracil-ADN-glycosylase (Ugi) de séquence GENBANK P14739 et en ce qu'il
30 inhibe la liaison entre l'uracil-ADN-glycosylase (UDG) et son inhibiteur, l'Ugi.

L'anticorps et le fragment d'anticorps anti-Ugi selon la présente invention sont des antagonistes de l'Ugi possédant les propriétés suivantes :

- ils se lient spécifiquement à l'Ugi et possèdent une forte affinité pour l'Ugi, et

- ils sont capables d'inhiber la liaison entre l'UDG et l'Ugi.

Ces propriétés peuvent être vérifiées par des tests classiques permettant d'évaluer l'activité de liaison d'un anticorps à une protéine ou à un peptide ou l'inhibition de cette activité, notamment par des tests ELISA directs ou en compétition. Par exemple, le titre en ELISA des anticorps polyclonaux anti-Ugi, vis-à-vis de l'Ugi recombinante purifiée, est élevé (plus de $1/10^6$).

Conformément à l'invention, ledit anticorps est un anticorps monoclonal ou un anticorps polyclonal et ledit fragment d'anticorps est un Fab, un Fv ou un scFv.

L'anticorps ou le fragment d'anticorps selon l'invention sont préparés par les techniques classiques connues de l'Homme du métier, telles que celles décrites dans *Antibodies : A Laboratory Manual*, E. Howell and D Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

De manière plus précise :

- l'inhibiteur de l'uracile-ADN-glycosylase est produit dans *E.coli* à partir d'un vecteur d'expression approprié, puis il est purifié, comme décrit dans Wang et al. (Genetics, 1991, 99, 31-37), les fragments peptidiques de l'Ugi sont produits par les techniques classiques de synthèse peptidique ou d'expression d'ADN recombinant.

- les anticorps polyclonaux sont préparés par immunisation d'un animal approprié avec l'inhibiteur de l'uracile-ADN-glycosylase ou l'un de ses fragments, éventuellement couplé à la KLH ou à l'albumine et/ou associé à un adjuvant approprié tel que l'adjuvant de Freund (complet ou incomplet) ou l'hydroxyde d'alumine ; après obtention d'un titre en anticorps satisfaisant, les anticorps sont récoltés par prélèvement du sérum des animaux immunisés et enrichis en IgG par précipitation, selon les techniques classiques, puis les IgG spécifiques de l'Ugi sont éventuellement purifiées par chromatographie d'affinité sur une colonne appropriée sur laquelle est fixée l'Ugi ou l'un de ses fragments, de façon à obtenir une préparation d'IgG monospécifiques.

- les anticorps monoclonaux sont produits à partir d'hybridomes obtenus par fusion de lymphocytes B d'un animal immunisé avec des myélomes, selon

la technique de Köhler et Milstein (Nature, 1975, 256, 495-497) ; les hybridomes sont cultivés *in vitro*, notamment dans des fermenteurs ou produits *in vivo*, sous forme d'ascite.

- les fragments d'anticorps sont produits à partir des régions V_H et V_L clonées, à partir des ARNm d'hybridomes ou de lymphocytes spléniques d'un animal immunisé ; par exemple, les fragments Fv, scFv ou Fab sont exprimés à la surface de phages filamenteux selon la technique de Winter et Milstein (Nature, 1991, 349, 293-299) ; après plusieurs étapes de sélection, les phages qui expriment les fragments d'anticorps spécifiques de l'antigène sont isolés et les ADNc correspondant auxdits fragments sont exprimés dans un système d'expression approprié, par les techniques classiques de clonage et d'expression d'ADN recombinant.

Les anticorps monoclonaux et polyclonaux ou leurs fragments tels que définis ci-dessus, sont purifiés par les techniques classiques connues de l'Homme du métier, notamment par chromatographie d'affinité.

Selon un mode de réalisation avantageux dudit anticorps, il s'agit d'un anticorps polyclonal obtenu par immunisation d'un animal avec une préparation d'inhibiteur de l'uracile-ADN-glycosylase recombinant.

La présente invention a également pour objet, l'utilisation d'un anticorps anti-Ugi tel que défini ci-dessus, comme antagoniste de la liaison entre l'Ugi et l'UDG.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, lesdits anticorps sont utilisés pour décontaminer les réactions d'amplification d'acides nucléiques, notamment les réactions de polymérisation en chaîne (PCR).

La présente invention a en outre pour objet, un procédé d'amplification d'acides nucléiques décontaminés, comprenant les étapes suivantes :

a) incubation d'un mélange réactionnel contenant : un échantillon d'acides nucléiques à amplifier, les réactifs nécessaires à son amplification incluant des nucléotides désoxyuridine triphosphate (dUTP), de l'uracile-ADN-glycosylase (UDG), de l'inhibiteur de l'uracile-ADN-glycosylase (Ugi), et un anticorps anti-Ugi, à une température comprise entre 25°C et 60°C, de préférence à 37°C, pendant un temps suffisant pour permettre la déglycosylation des acides nucléiques contenant de la désoxyuridine, et

b) incubation dudit mélange à une température comprise entre 60°C et 98°C, de préférence entre 90°C et 98°C, pendant un temps suffisant pour permettre la dénaturation de l'anticorps anti-Ugi et la libération de l'Ugi, et

c) amplification de l'ADN dans des conditions appropriées.

5 Conformément à l'invention :

- ledit mélange réactionnel de l'étape a) comprend l'échantillon d'acides nucléiques à amplifier (ADN ou ADNc), des nucléotides dATP, dCTP, dGTP dUTP, des amorces oligonucléotidiques, des ions Mg^{2+} et une polymérase à ADN, dans un tampon approprié,

10 - la durée de l'incubation à l'étape a) varie en fonction de la quantité d'ADN contaminant (ADN contenant de la désoxyuridine) à dégrader par l'uracil-ADN-glycosylase et peut être déterminée expérimentalement ; elle est généralement de moins d'une heure, de préférence de 30 s à 30 min, de manière préférée de 5 min à 10 min.

15 - la durée de l'incubation à l'étape b) est généralement de moins d'une heure, de préférence de 30s à 30 min, de manière préférée de 5 min à 10 min.

Le procédé selon l'invention qui comprend la digestion de l'ADN contaminant par l'UDG (étape a) puis la libération de l'Ugi (étape b) à partir d'un mélange réactionnel de départ, permet de décontaminer l'ADN sans détruire l'ADN
20 nouvellement synthétisé et n'implique pas d'étape supplémentaire d'addition de l'Ugi, soit à la fin de l'étape de décontamination, soit à la fin de la réaction d'amplification. De manière plus précise :

- à l'étape a), l'UDG active détruit les acides nucléiques contaminants contenant du dUTP alors que l'Ugi est inactivé sous forme de complexes reversibles, Ugi/anticorps anti-Ugi,
25

- à l'étape b), la chaleur inactive l'UDG, dissocie les complexes Ugi-anticorps et dénature les anticorps de façon irréversible, alors que l'Ugi est libéré,

- à l'étape c), l'Ugi se lie à l'UDG sous forme de complexes UDG-Ugi et inhibe l'activité de l'UDG au cours des étapes ultérieures d'amplification de
30 l'ADN.

Au sens de la présente invention, on entend par complexe Ugi-anticorps anti-Ugi réversible, un complexe stable en présence d'UDG mais qui est

dissocié par l'action de la chaleur qui dénature de façon irréversible les anticorps anti-Ugi. .

La présente invention a en outre pour objet un kit de décontamination des réactions d'amplification d'acides nucléiques, caractérisé en ce qu'il comprend
5 au moins un anticorps ou un fragment d'anticorps selon la présente invention, de préférence sous la forme de complexes réversibles Ugi-anticorps ou Ugi-fragment d'anticorps.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à
10 des exemples de préparation des anticorps anti-Ugi objet de la présente invention. et de la mise en œuvre de ces anticorps pour la décontamination des réactions d'amplification d'acides nucléiques, ainsi que des dessins annexés dans lesquels :

- la figure 1 illustre la mise au point de la concentration en UDG dans le mélange réactionnel ; un large excès d'ADN contaminant (100 ng) contenant
15 du dUTP ou du dTTP (contrôle) est digéré pendant une heure à 37°C dans un mélange réactionnel contenant de l'UDG diluée au 1/25 ou au 1/50, correspondant aux concentrations finales de respectivement 0,04 U/μL et 0,02 U/μL. A : ADN dUTP. B : ADN dUTP + UDG 1/25. C : ADN dUTP + UDG 1/50. D : marqueur de poids moléculaire. E : ADN dTTP. F : ADN dTTP + UDG 1/25. G : ADN dTTP + UDG 1/50.

- la figure 2 illustre la mise au point de la durée de la digestion de
20 l'ADN contaminant par l'UDG ; un large excès d'ADN contaminant (100 ng) contenant du dUTP a été digéré pendant 30 min (A et B) ou une heure (D et E) à 37°C dans un mélange réactionnel sans UDG (B et E) ou contenant de l'UDG dilué au 1/25 (0,04 U/μL : A et D).

- la figure 3 illustre la mise au point de la concentration en Ugi permettant d'inhiber la digestion de l'ADN contaminant par l'UDG ; un large excès d'ADN contaminant (100 ng) contenant du dUTP a été digéré pendant 60 min à 37°C, en présence d'UDG dilué au 1/25 ou au 1/50 et d'Ugi dilué au 1/20000 ou au 1/30000 (C, D, E, G, H, I), ou bien pendant 90 min à 37°C, en présence d'UDG dilué au 1/50 et d'Ugi dilué au 1/20000 ou au 1/30000 (K, L, M) . A : ADN dUTP. B, F et J :
30 marqueur de poids moléculaire. C : ADN dUTP + UDG 1/25. G et K : ADN dUTP + UDG 1/50. D : ADN dUTP + UDG 1/25 + Ugi 1/20000. E : ADN dUTP + UDG 1/25

+ Ugi 1/30000. **H et L** : ADN dUTP + UDG 1/50 + Ugi 1/20000. **I et M** : ADN dUTP + UDG 1/50 + Ugi 1/30000.

- la figure 4 illustre la mise au point de la concentration en sérum immun anti-Ugi (I.S.) permettant d'antagoniser l'effet inhibiteur de l'Ugi sur la digestion de l'ADN contaminant par l'UDG ; le sérum pré-immun (P.I.) est utilisé
 5 comme contrôle. L'ADN de 460 pb amplifié en présence de dUTP (ADN-dUTP) a été digéré pendant 90 min à 37°C, en présence d'UDG diluée au 1/50, d'Ugi dilué au 1/20000 ou au 1/30000, et de sérum immun anti-Ugi dilué au 1/100 ou de sérum pré-immun dilué au 1/100. **A** : marqueur de poids moléculaire. **B** : ADN-dUTP + UDG
 10 1/50. **C** : ADN-dUTP + UDG 1/50 + Ugi 1/20000 + P.I. 1/100. **D** : ADN-dUTP + UDG 1/50 + Ugi 1/30000 + P.I. 1/100. **E** : ADN-dUTP + UDG 1/50 + Ugi 1/20000 + I.S. 1/100. **F** : ADN-dUTP + UDG 1/50 + Ugi 1/30000 + I.S. 1/100.

- la figure 5 illustre la mise au point des conditions de dénaturation des anticorps anti-Ugi ; deux séries identiques de l'ADN de 460 pb amplifié en
 15 présence de dUTP (ADN-dUTP) sont mises en présence d'UDG diluée au 1/35, d'Ugi dilué au 1/20000 ou au 1/30000, et de sérum immun anti-Ugi dilué au 1/100 ou de sérum pré-immun dilué au 1/100. Préalablement à l'étape de digestion de 60 minutes à 37°C, l'une des deux séries est pré-incubée 10 min à 90°C (**J, K, L, M, N et O**). **A** : ADN-dUTP. **B** : ADN-dUTP + UDG 1/35. **C** : marqueur de poids moléculaire. **D et**
 20 **J** : ADN-dUTP + UDG 1/35 + Ugi 1/20000. **E et K** : ADN-dUTP + UDG 1/35 + Ugi 1/20000 + P.I. 1/100. **F et L** : ADN-dUTP + UDG 1/35 + Ugi 1/20000 + I.S. 1/100. **G et M** : ADN-dUTP + UDG 1/35 + Ugi 1/30000. **H et N** : ADN-dUTP + UDG 1/35 + Ugi 1/30000 + P.I. 1/100. **I et O** : ADN-dUTP + UDG 1/35 + Ugi 1/30000 + I.S. 1/100.

- la figure 6 illustre l'amplification PCR de l'ADN matriciel dans les conditions de décontamination établies à l'exemple 2 ; l'ADN contaminant (ADN-dUTP) est mélangé avec l'ADN plasmidique matriciel (ADN contenant du dTTP), l'UDG 1/35, en association ou non avec l'Ugi (1/20000 ou 1/30000) et avec le sérum immun anti-Ugi (I.S.) ou le sérum pré-immun (P.I., contrôle), et amplifié dans les
 30 conditions telles que définies à l'exemple 2. **A** : marqueur de poids moléculaire. **B** : ADN-dUTP. **C** : ADN-dUTP + UDG 1/35. **D** : ADN-dUTP + UDG 1/35 + Ugi 1/20000. **E** : ADN-dUTP + UDG 1/35 + Ugi 1/20000 + P.I. 1/100. **F** : ADN-dUTP +

UDG 1/35 + Ugi 1/20000 + I.S. 1/100. G : ADN-dUTP + UDG 1/35 + Ugi 1/30000.
H : ADN-dUTP + UDG 1/35 + Ugi 1/30000 + P.I. 1/100. I : ADN-dUTP + UDG 1/35
+ Ugi 1/30000 + P.I. 1/100. Panneau supérieur : incubation 60 minutes à 37°C.
Panneau inférieur : incubation 60 minutes à 37°C et amplification PCR dans les
5 conditions telles que définies à l'exemple 2.

**EXEMPLE 1: Préparation et caractérisation d'anticorps polyclonaux dirigés
contre l'Ugi**

1) Préparation d'Ugi recombinante (rUgi)

Des oligonucléotides chevauchant représentant la séquence codante
10 complète de l'Ugi (Wang et Mosbaugh, J. Biol. Chem., 1989, 264, 1163-) ont été
hybridés par leur séquence complémentaire, puis allongés et amplifiés par réaction de
polymérisation en chaîne (PCR). Le produit d'amplification obtenu a été digéré par
des enzymes de restriction appropriées, cloné dans le vecteur pUC18 (PHARMACIA)
puis la conformité de la séquence insérée dans le plasmide recombinant a été vérifiée
15 par séquençage automatique. Un fragment du plasmide pUC18 recombinant
correspondant à la séquence codant pour l'Ugi a ensuite été cloné dans le vecteur
d'expression pQE80L (QIAGEN). La souche DH5α d'*E. coli* a été transformée par le
vecteur d'expression recombinant ainsi obtenu et la protéine Ugi recombinante
produite par les bactéries transformées a été purifiée sur un support Ni-NTA agarose,
20 selon les recommandations du fabricant (QIAGEN). De manière plus précise, l'Ugi
recombinante retenue sur le support NiNTA a été éluée en présence de 100 mM ou
250 mM d'imidazole puis l'imidazole présent a été éliminé par ultra-filtration.

L'analyse de la préparation de protéine obtenue par électrophorèse en
gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes puis coloration au bleu de
25 Coomassie, montre que le protocole employé permet de purifier la protéine Ugi avec
une homogénéité très satisfaisante et un rendement moyen de 10 mg de protéine par
litre de culture.

2) Préparation d'un sérum immun polyclonal anti-rUgi

2.1) Couplage de la rUgi à la KLH

30 La protéine Ugi recombinante purifiée (rUgi) préparée selon le
protocole décrit au paragraphe précédent a été couplée à la KLH (Keyhole Limpet
Hemocyanin, PIERCE), à l'aide de glutaraldéhyde (SIGMA), en suivant le protocole

de couplage décrit dans Habeeb et Hiramoto et al. (Arch. Biochem. Biophys., 1998, 126, 6-). Alternativement, la protéine Ugi recombinante est celle disponible chez un fournisseur comme NEW ENGLAND BIOLABS (référence M0281). La rUgi couplée à la KLH a ensuite été purifiée et le rapport moléculaire rUgi/KLH a été
5 calculé, selon le protocole décrit dans Briand et al., Immunol. Methods, 1985, 93, 9-). La préparation de rUGi est estimée à environ 500 molécules de rUgi par molécule de KLH.

2.2) Immunisation de lapins.

Des lapins ont été immunisés avec la rUgi couplée à la KLH préparée selon le protocole décrit au paragraphe précédent. Après une première injection
10 intradermique multipoints de 0,15 mg par lapin, de protéine couplée, émulsionnée en adjuvant complet de Freund, les animaux ont reçu deux injections de rappel à trois semaines d'intervalle, de 0,025 mg de protéine couplée, émulsionnée en adjuvant incomplet de Freund.

Pour chaque lapin, un sérum pré-immun (P.I.) a été préparé avant la première immunisation et un immun-sérum (I.S.), une semaine après la dernière immunisation.
15

3) Analyse de la réactivité en ELISA d'un sérum polyclonal anti-Ugi

La réactivité des sérums a été analysée par test ELISA, vis à vis d'une préparation de protéine recombinante semblable à celle utilisée pour les immunisations.
20

La protéine Ugi recombinante diluée au 1/1000 dans du tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH 7,4 est distribuée à raison de 100 µl (0,1 µg) dans les puits de plaques ELISA, puis les plaques sont incubées une nuit à température du laboratoire. Les plaques sont lavées avec du tampon PBS-Tween 20 (0,1 %), saturées avec du tampon PBS- Fraction V de la sérum albumine bovine (BSA : 1 %). Les sérums à tester (100 µl) préalablement dilués sont ajoutés, puis les plaques sont incubées 1 h à 37° C. Après 3 lavages, le conjugué anti-IgG de lapin marqué à la peroxydase est ajouté à la dilution recommandée par le fabricant puis les plaques sont
25 incubées 1 h à 37 °C. Après 4 lavages, le chromogène (ortho-phénylène-diamine, OPD) et le substrat (H₂O₂, 110 volumes) sont ajoutés et les plaques sont incubées 20 min à température ambiante, à l'abri de la lumière. La réaction est ensuite arrêtée par
30

addition d'acide sulfurique (H_2SO_4 , 12,5 %) puis l'absorbance à 492 nm est mesurée à l'aide d'un lecteur automatique.

Les résultats des tests ELISA démontrent que la préparation de protéine Ugi recombinante est immunogène chez l'animal et que le titre des sérums
5 immuns est élevé (plus de $1/10^6$).

EXEMPLE 2 : Mise au point des conditions de la décontamination en présence de complexes Ugi-anticorps anti-Ugi.

1) Matériel et méthode

a) amorces/matrice ADN

10 Les amorces CytTo5' (atggtgaaggccgtcgccgtc, SEQ ID NO : 1) et CytTo3' (ttaacctggaggccaataat, SEQ ID NO : 2) sont utilisées pour amplifier un fragment de 460 pb correspondant à l'ADNc codant pour la SOD cytosolique à cuivre-zinc de tomate (GENBANK X1040 et Perl-Treves, R. et al., Plant Mol. Biol., 1988, 11, 609-623), à partir d'un plasmide recombinant contenant ledit ADNc, utilisé
15 comme matrice pour la réaction d'amplification en chaîne (PCR).

b) réaction d'amplification (PCR)

Le mélange réactionnel contient dans un volume de 50 µl de tampon PCR : matrice ADN (25 ng), amorces (0,2 µM), MgCl_2 (1,5 mM), chacun des dNTP (200 µM) sous forme d'un mélange incluant du dTTP (contrôle) ou du dUTP, et
20 l'ADN polymérase (Taq, 2,5 UI).

L'amplification est réalisée dans les conditions suivantes : une étape initiale de dénaturation à 95°C pendant 5 min est suivie de 30 cycles comprenant : une étape de dénaturation à 94°C pendant 40 sec, une étape d'hybridation à 58°C pendant 40 sec puis une étape d'élongation à 72°C pendant 50 sec, puis d'une étape finale
25 d'élongation à 72°C pendant 10 min. Les produits d'amplification obtenus sont conservés à + 4°C avant d'être analysés par électrophorèse en gel d'agarose (1,2% en tampon TAE), en présence de bromure d'éthidium.

c) autres réactifs

- ADN contaminant

30 L'ADN contaminant est constitué par un produit d'amplification comme ci-dessus, obtenu en présence de dUTP ; il est utilisé en large excès (100 ng), afin de pouvoir être visualisé sur un gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium.

L'ADN amplifié de façon similaire, mais en présence de dTTP au lieu de dUTP, est utilisé comme contrôle de la spécificité de la décontamination.

- UDG

L'UDG (LIFE TECHNOLOGIES ; 1 UI/ μ L) est utilisée aux dilutions 1/25, 1/35 et 1/50 correspondant respectivement aux concentrations finales suivantes : 0,04 U/ μ L, 0,028 U/ μ L et 0,02 U/ μ L.

- rUgi

La rUgi préparée comme décrit à l'exemple 1 (1,1 mg/ml), est utilisée aux dilutions 1/20000, 1/30000 correspondant respectivement aux concentrations finales suivantes : 55 ng/ml et 36 ng/ml

- anticorps

Le sérum immun anti-Ugi et le sérum préimmun servant de contrôle, préparés comme décrit à l'exemple 1, sont utilisés au 1/100.

2) Détermination de la concentration en UDG et de la durée de digestion de

15 l'ADN contaminant par l'UDG

Après avoir vérifié que l'ADN de 460 pb était amplifié de façon similaire, en présence de dTTP ou de dUTP, les produits d'amplification ainsi obtenus dénommés (ADN-dTTP et ADN-dUTP ; 100 ng) ont été digérés pendant une heure à 37°C, en présence d'UDG diluée au 1/25 ou au 1/50 (figure 1), ou bien pendant 30 min ou une heure à 37°C, en en présence d'UDG diluée au 1/25 (figure 2).

Les figures 1 et 2 montrent qu'un large excès d'ADN contaminant (100 ng), est digéré de façon complète et spécifique, par une incubation d'une heure à 37°C, en présence d'UDG diluée au 1/25 (0,04 U/ μ L).

3) Détermination de la concentration en Ugi permettant d'inhiber la digestion de

25 l'ADN contaminant par l'UDG

L'ADN de 460 pb amplifié en présence de dUTP (ADN-dUTP) a été digéré pendant 60 min à 37°C, en présence d'UDG diluée au 1/25 ou au 1/50 et d'Ugi dilué au 1/20000 ou au 1/30000, ou bien pendant 90 min à 37°C, en présence d'UDG diluée au 1/50 et d'Ugi dilué au 1/20000 ou au 1/30000 (figure 3).

La figure 3 montre qu'à la concentration la plus forte d'UDG, l'activité de l'UDG peut-être inhibée par l'Ugi au 1/20000 mais pas au 1/30000. En revanche, à la concentration la plus faible d'UDG, l'activité de l'UDG est inhibée

aussi bien par l'Ugi au 1/20000 qu'au 1/30000.

4) Détermination de la concentration en sérum immun anti-Ugi permettant d'antagoniser l'effet inhibiteur de l'Ugi sur la digestion de l'ADN contaminant par l'UDG

5 L'ADN de 460 pb amplifié en présence de dUTP (ADN-dUTP) a été digéré pendant 90 min à 37°C, en présence d'UDG diluée au 1/50, d'Ugi dilué au 1/20000 ou au 1/30000, et de sérum immun anti-Ugi dilué au 1/100 ou de sérum pré-immun dilué au 1/100.

10 La figure 4 montre qu'aux deux concentrations d'Ugi testées, le sérum anti-Ugi est capable d'antagoniser l'effet inhibiteur de l'Ugi sur l'UDG, permettant ainsi à l'UDG de digérer complètement l'ADN contaminant.

5) Détermination des conditions de dénaturation des anticorps anti-Ugi

15 L'ADN de 460 pb amplifié en présence de dUTP (ADN-dUTP) est pré-incubé ou non pendant 10 minutes à 90°C, en présence d'UDG diluée au 1/35, d'Ugi dilué au 1/20000 ou au 1/30000, et de sérum immun anti-Ugi dilué au 1/100 ou de sérum pré-immun dilué au 1/100, puis les différents mélanges sont digérés pendant 60 min à 37°C.

La figure 5 montre que dans ces conditions que :

- 20 - l'ADN contaminant (ADN-dUTP) est bien digéré par l'UDG (piste B),
- les deux dilutions d'Ugi inhibent bien la digestion de l'ADN par l'UDG (pistes D et G) et que cette inhibition est antagonisée par le sérum immun anti-Ugi (pistes F et I),
- après un traitement de 10 minutes à 90°C, l'Ugi reste active car elle 25 inhibe toujours l'UDG (pistes J et M) et protège donc l'ADN contaminant de la digestion par l'UDG,
- après ce même traitement l'anticorps a été dénaturé et il est alors incapable d'antagoniser l'effet inhibiteur de l'Ugi (pistes L et O),
- 30 - après ce même traitement, l'Ugi ainsi libéré devient alors capable d'inhiber l'UDG et empêche la dégradation de l'ADN-dUTP.

6) Amplification d'ADN décontaminés dans les conditions de décontamination ainsi déterminées.

L'ADN contaminant (ADN-dUTP) est mélangé avec l'ADN plasmidique matriciel, l'UDG (1/35), en association ou non avec l'Ugi (1/20000 ou 1/30000) et le sérum immun anti-Ugi (I.S., 1/100) ou le sérum préimmun (P.I., contrôle, 1/100) et amplifié dans les conditions telles que définies au paragraphe 1.

La figure 6 montre que :

- après une incubation de 60 minutes à 37°C, l'UDG au 1/35 digère bien l'ADN dUTP mais pas l'ADN matriciel qui contient du dTTP (piste C),
- 10 - les deux dilutions d'Ugi inhibent bien l'UDG (pistes D et G) et le sérum pré-immun n'a pas d'effet sur cette inhibition (pistes E et H),
- l'anticorps anti-Ugi antagonise l'effet inhibiteur de l'Ugi sur l'UDG, permettant ainsi à l'UDG de digérer complètement l'ADN contaminant (pistes F et I),
- 15 - les différents constituants du mélange réactionnel qui permettent de dégrader l'ADN contaminant à partir d'un mélange réactionnel unique, n'interfèrent, ni avec l'amplification de l'ADN matriciel après 30 cycles d'amplification, ni avec l'intégrité du produit d'amplification obtenu (pas de dégradation de l'ADN-dUTP néo-synthétisé).

REVENDICATIONS

1°) Anticorps ou fragment fonctionnel d'anticorps comprenant au moins les domaines variables des chaînes lourdes et légères, caractérisé en ce qu'il se lie spécifiquement à l'inhibiteur de l'uracile-ADN-glycosylase de séquence
5 GENBANK P14739 et en ce qu'il inhibe la liaison entre l'uracile-ADN-glycosylase et ledit inhibiteur.

2°) Anticorps ou fragment d'anticorps selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les anticorps monoclonaux, les anticorps polyclonaux et les fragments Fab, Fv et scFv.

10 3°) Anticorps selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un anticorps polyclonal obtenu par immunisation d'un animal avec une préparation d'inhibiteur de l'uracile-ADN-glycosylase recombinant.

4°) Utilisation d'un anticorps ou d'un fragment d'anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, comme antagoniste de la liaison entre
15 l'uracile-ADN-glycosylase et son inhibiteur.

5°) Utilisation selon la revendication 4, pour décontaminer les réactions d'amplification d'acides nucléiques, notamment les réactions de polymérisation en chaîne.

6°) Procédé d'amplification d'acides nucléiques décontaminés,
20 caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

a) incubation d'un mélange réactionnel contenant : un échantillon d'acides nucléiques à amplifier, les réactifs nécessaires à son amplification incluant des nucléotides désoxyuridine triphosphate, de l'uracile-ADN-glycosylase, de l'inhibiteur de l'uracile-ADN-glycosylase, et un anticorps ou un fragment d'anticorps
25 anti-inhibiteur de l'uracile-ADN-glycosylase selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, à une température comprise entre 25°C et 60°C, de préférence à 37°C, pendant un temps suffisant pour permettre la déglycosylation des acides nucléiques contenant de la désoxyuridine, et

b) incubation dudit mélange à une température comprise entre 60°C
30 et 98°C, de préférence entre 90°C et 98°C, pendant un temps suffisant pour permettre la dénaturation des anticorps anti-inhibiteur de l'uracile-ADN-glycosylase et la libération de l'Ugi, et

c) amplification de l'ADN dans des conditions appropriées.

7°) Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'incubation aux étapes a) et b) est réalisée pendant moins d'une heure, de préférence pendant 30 s à 30 min, de manière préférée pendant 5 min à 10 min.

5 8°) Procédé selon la revendication 6, caractérisée en ce que l'anticorps anti-inhibiteur de l'uracile-ADN-glycosylase et l'inhibiteur de l'uracile-ADN-glycosylase forment un complexe réversible.

9°) Kit de décontamination des réactions d'amplification d'acides nucléiques, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un anticorps ou un fragment
10 d'anticorps selon la revendication 1 ou la revendication 2, de préférence sous la forme de complexe réversible avec l'inhibiteur de l'uracile-ADN-glycosylase.

1/6

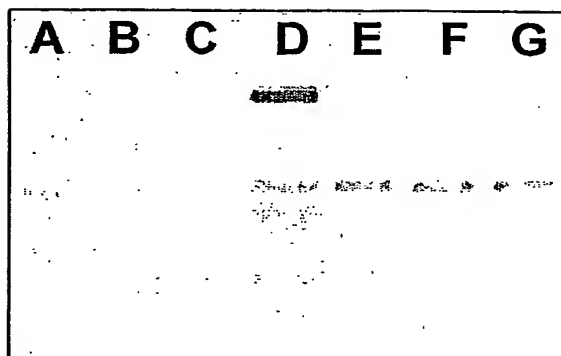
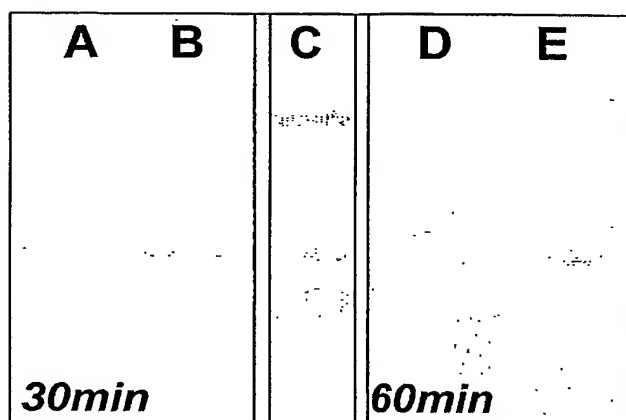


Figure 1

2/6

**Figure 2**

4/6

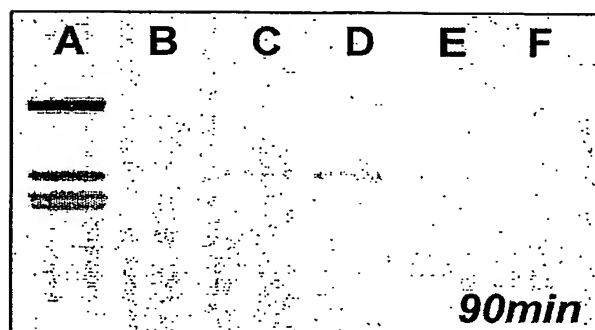


Figure 4

5/6

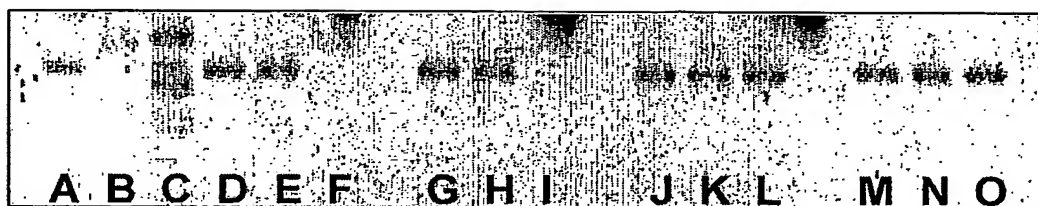


Figure 5

6/6

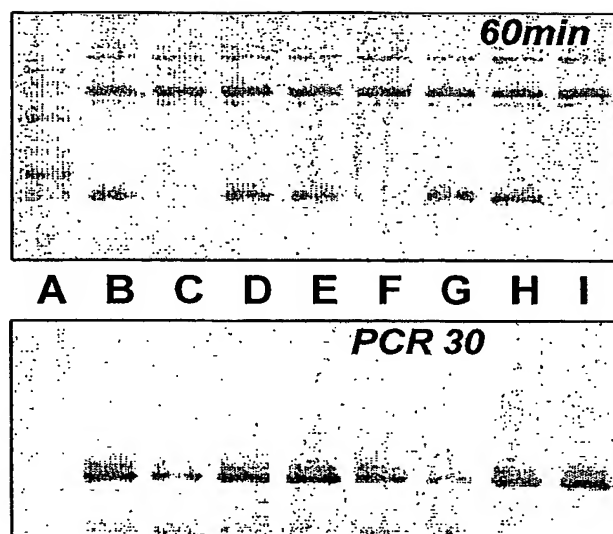


Figure 6

s1422PCT1.ST25
SEQUENCE LISTING

<110> KABERTEK

CALENDA, Alphonse

MONTANARI, Bernard

MONTANARI, Bruno

<120> Anticorps anti-inhibiteur de l'uracile-ADN-glycosylase et leurs applications pour la décontamination des réactions d'amplification des acides nucléiques

<130> s1422FR1

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> amorce

<400> 1

atggtgaagg ccgtcgccgt c

21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> amorce

<400> 2

ttaaccctgg aggccaataa t

21